

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152364

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

能源硅藻优良藻种的筛选

Bioenergy-algae collection focused on Diatoms

赵 方 钰

指导教师姓名: 梁君荣 副教授

专 业 名 称: 水生生物学

论文提交日期: 2013 年 07 月

论文答辩时间: 2013 年 09 月

学位授予日期: 2013 年 09 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前 言.....	1
1.1 生物柴油及微藻生物质能.....	1
1.1.1 生物柴油的发展.....	1
1.1.2 微藻的优势.....	4
1.1.3 微藻生物柴油的生产流程.....	5
1.2 硅藻在生物质能生产上的优势.....	9
1.3 脂类快速检测方法.....	10
1.3.1 染色法.....	10
1.3.2 其他检测方法.....	11
1.4 环境因子对微藻脂类积累的影响.....	12
1.4.1 营养盐.....	13
1.4.2 生长周期.....	15
1.4.3 二氧化碳.....	16
1.4.4 其他因素.....	16
1.5 本论文研究的主要内容和意义.....	17
第二章 材料与方 法.....	19
2.1 样品采集，分离与鉴定.....	19
2.1.1 样品采集.....	19
2.1.2 藻种分离方法.....	19
2.1.3 藻种鉴定.....	20
2.2 传统称重法测粗脂含量.....	20
2.2.1 藻种培养.....	20
2.2.2 粗脂提取方法.....	21

2.3 Nile red 染色法测细胞内脂含量.....	21
2.3.1 Nile red 染色条件优化.....	21
2.3.2 Nile red 染色效果与传统称重法结果的比较.....	22
2.4 以奇异棍形藻为材料检测油脂积累的过程.....	22
2.4.1 藻细胞培养.....	22
2.4.2 藻细胞生长及油脂积累情况的测定.....	22
2.4.3 培养基参数测定.....	22
2.5 假微型海链藻在不同 CO ₂ 浓度条件下的油脂积累情况.....	26
2.6 主要试剂与仪器.....	28
2.6.1 主要培养基.....	28
2.6.2 主要仪器.....	29
第三章 实验结果.....	30
3.1 藻种鉴定结果.....	30
3.1.1 实验分离获得的藻种（株）.....	30
3.1.2 藻株的种类鉴定与生境描述.....	31
3.2 硅藻的生物学特征及粗脂含量.....	40
3.2.1 硅藻的生物学特征.....	40
3.2.2 细胞粗脂含量及生物量.....	43
3.3 Nile red 染色条件优化结果.....	44
3.3.1 激发光波长优化结果.....	45
3.3.2 黑暗孵育时间优化结果.....	46
3.4 传统称重法与 Nile red 染色法比较.....	48
3.5 细胞内中性脂积累与细胞生长关系的探究.....	50
3.5.1 奇异棍形藻 Nile red 染色情况及生长情况测定结果.....	50
3.5.2 藻细胞油脂积累与细胞生长周期之间的关系.....	53
3.5.3 藻细胞油脂积累与培养基中营养盐消耗之间的关系.....	54
3.6 藻类油脂积累与二氧化碳浓度的关系初探.....	56
3.6.1 藻种的选取.....	56

3.6.2 假微型海链藻在不同二氧化碳浓度培养下生长情况.....	57
3.6.3 假微型海链藻在不同二氧化碳浓度培养下叶绿素 a 含量变化情况.....	60
3.6.4 假微型海链藻在不同二氧化碳浓度培养下油脂积累情况.....	61
第四章 讨 论.....	63
4.1 能源硅藻的筛选方法.....	63
4.2 能源硅藻的筛选结果及其优势.....	65
4.3 环境因子对油脂积累的影响.....	71
4.3.1 营养盐对油脂积累的影响.....	71
4.3.2 二氧化碳对油脂积累的影响.....	73
第五章 总结与展望.....	76
5.1 总结.....	76
5.2 展望.....	77
参考文献.....	78
在学期间发表的论文和参与的课题.....	87
致 谢.....	88

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1. Introduction	1
1.1 Biodiesel and microalgae biofuel.....	1
1.1.1 History of biodiesel development	1
1.1.2 Advantages of microalgae for biofuel production	4
1.1.3 Procedure of microalgae biodiesel production	5
1.2 Advantages of diatoms for biofuel production	9
1.3 Methods for lipids detection	10
1.3.1 Staining methods.....	10
1.3.2 Other detecting methods	11
1.4 Effects of environmental factors on microalgae lipids accumulation ...	12
1.4.1 Nutrients.....	13
1.4.2 Growth period	15
1.4.3 Carbon dioxide.....	16
1.4.4 Other factors.....	16
1.5 Purpose and significance of this study.....	17
Chapter 2. Material and methods.	19
2.1 Sample collection, isolation and identification.....	19
2.1.1 Sample collection.....	19
2.1.2 Species isolation methods	19
2.1.3 Species identification	20
2.2 Lipid content determination by traditional gravimetric method.....	20
2.2.1 Algae cultivation.....	20
2.2.2 Lipid extraction.....	21
2.3 Lipid content determination by Nile red fluorescence method.....	21
2.3.1 Optimization of the Nile red fluorescence method	21

2.3.2 Comparison of lipid content by Nile red fluorescence method and traditional gravimetric method	22
2.4 Monitoring the lipid accumulation process based on <i>Bacillaria paradoxa</i>	22
2.4.1 Algae cultivation	22
2.4.2 Determine the cell growth and lipid accumulation	22
2.4.3 Determine the nutrient concentration in the culture	22
2.5 Lipid accumulation under different carbon dioxide concentrations based on <i>Thalassiosira pseudonana</i>	26
2.6 Main reagents and instruments	28
2.6.1 Main reagents	28
2.6.2 Main instruments	29
Chapter 3. Results	30
3.1 Results of diatom identification	30
3.1.1 Basic information of freshly isolated species	30
3.1.2 Description of freshly isolated species	31
3.2 Results of diatom characteristics and total lipid contents.....	40
3.2.1 Characteristics of lipid-extracted species.....	40
3.2.2 Biomass and lipid content of lipid-extracted species.....	43
3.3 Results of the modified Nile red fluorescence method.....	44
3.3.1 Optimization of excitation wavelength.....	45
3.3.2 Optimization of staining time	46
3.4 Comparison results of Nile red fluorescence intensity and lipid content	48
3.5 Determine the relationship between lipid accumulation and cell cultivation.....	50
3.5.1 Nile red staining results and cell growth condition based on <i>Bacillaria paradoxa</i>	50
3.5.2 Relationship between lipid accumulation and growth period.....	53
3.5.3 Relationship between lipid accumulation and nutrient consumption in culture .	54
3.6 Determine the relationship between lipid accumulation and carbon dioxide concentration	56

3.6.1 Suitable diatom species selection.....	56
3.6.2 Cell growth under different carbon dioxide concentration for <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivation	57
3.6.3 Chlorophyll a content under different carbon dioxide concentration for <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivation	60
3.6.4 Lipid accumulation under different carbon dioxide concentration for <i>Thalassiosira pseudonana</i> cultivation	61
Chapter 4. Discussion	63
4.1 The screening method for bioenergy-diatom.....	63
4.2 The advantages of screened biofuel diatoms	65
4.3 Effects of environment factors on lipid accumulation.....	71
4.3.1 Effects of nutrients on lipid accumulation	71
4.3.2 Effects of carbon dioxide on lipid accumulation	73
Chapter 5. Conclusion and prospect	76
5.1 Conclusion.....	76
5.2 Prospect	77
References	78
Published papers and participated research projects	87
Acknowledgements	88

摘 要

随着人类长期无节制地使用化石燃料,地球历经亿万年累积下来的石油、天然气和煤炭正日益走向枯竭。与此同时,由其引发的全球气候变暖加剧,使得研发可持续利用的清洁能源受到广泛的关注。微藻,作为第三代制备生物柴油的原料,以其生长周期短、脂类含量高、可固定二氧化碳、土地需求量少等突出的优势进入了科学家的视野。

硅藻作为一类单细胞真核藻类,其生产力占海洋初级生产力近 40%,固定的二氧化碳量可达到世界上所有热带雨林量的总和。硅藻生境广泛,物种多样性丰富,培养形式多样,且以生物柴油制备的首选原料——中性脂为其能量储存的主要形式,加之硅藻壳还可作为高价值材料用于制作半导体、生物传感器、太阳能电池等。因此硅藻作为能源微藻藻种具有巨大的潜力。

本论文以硅藻为基础进行能源微藻的筛选及培养工作,其研究结果如下:

1) 从不同生境的水样和泥样中新分离了 14 株硅藻,2 株中心纲(包含海链藻属和双尾藻属),12 株羽纹纲(包含曲壳藻属、菱形藻属、斜纹藻属、菱板藻属、褐指藻属、卵形藻属、普氏藻属、舟形藻属和双眉藻属)。其中,普氏藻(*Proschkinia buluheimii*)、柔软舟形藻(*Navicula mollis*)、盐生舟形藻(*Navicula halophila*)和普氏藻(*Proschkinia* sp.)可生长于盐度高于 120‰的水域。

2) 测定了 21 株硅藻的生物量及粗脂含量,包括 14 株新分离的藻株和 7 株实验室藻种库已保存的藻株。筛选结果表明粗脂含量超过细胞干重 20%的有 15 株,其中美丽曲壳藻(*Achnanthes amoena*)和普氏藻(*Proschkinia* sp.)的粗脂含量超过细胞干重的 40%,分别为 48.61%和 41.42%。综合考虑生物量、粗脂含量以及生产成本等因素,奇异棍形藻(*Bacillaria paradoxa*)、柔软舟形藻(*N. molli*)、盐生舟形藻(*N. halophila*)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)可能成为适于生物能源生产的候选藻种。

3) 以奇异棍形藻(*B. paradoxa*)为材料探究藻细胞培养期间油脂的积累过程。实验表明油脂的积累始于生长稳定期,且培养基中氮、磷和硅的含量与油脂的积累有显著的负相关性。其中硅的消耗速度最快,在指数生长期的第二天,培养基中硅含量

减少一半，而第六天形成硅饥饿状态，细胞生长进入稳定期。

4) 以假微型海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*) 为材料探究二氧化碳浓度对藻细胞生长及油脂积累的影响。实验表明随着二氧化碳浓度的增高，藻体的适应期也在延长。藻细胞在 5% CO₂ 浓度下生长最为迅速，且在该条件下培养六天的细胞粗脂含量最高，可达 31% (干重)。

5) 建立了以 Nile red 染色法为基础的能源硅藻筛选体系，并探究了染色效果的可靠性。确定染色条件为：以终浓度为 1 μg · mL⁻¹ 的 Nile red 试剂，在黑暗孵育 10 min 后选取 530 nm 激发光测定目标藻种在 575 nm 处发出的荧光强度。

关键词：能源微藻，硅藻，生物量，粗脂含量，二氧化碳

Abstract

Due to the exhaustion of fossil fuel and the global warming problems, clean and renewable energy is imminently demanded. As the third-generation biofuel feedstocks, microalgae have got more and more attention because of their shorter growth period, carbon dioxide fixation and no competition with arable land.

Diatoms are a group of unicellular eukaryotic microalgae which can fix carbon dioxide via photosynthesis. They are one of the more productive and ecologically successful classes of algae, being responsible for approximately 40% of marine primary productivity, and fix as much carbon dioxide as all the rainforests of the world combined. In addition, diatoms could inhabit in a variety of environmental conditions. Their species diversity are huge, and the kinds of cultivation condition are multiple. The main form of energy storage in diatoms is neutral lipids, which are the best feedstocks for biodiesel in the light of the easy conversion by transesterification. Moreover, the diatom-specific nanoscale-level siliceous cell wall can be manufactured into high-value materials and microdevices that are superior to current products, such as semiconductors, biosensors, solar cells and batteries, which other groups of microalgae are unable to achieve. Therefore, diatoms are significant for their potential as biofuel production.

In this study, we screened suitable bioenergy-algae on the basis of diatoms, and investigated the cultivation conditions for lipid accumulation, the main results showed as follows:

1) Fourteen diatom species were isolated freshly from the water and mud samples which were taken from different environmental conditions, 2 Centricae (including *Thalassiosira*, *Ditylum*) and 12 Pennatae (including *Achnanthes*, *Nitzschia*, *Pleurosigma*, *Hantzschia*, *Phaeodactylum*, *Cocconeis*, *Proschkinia*, *Navicula* and *Amphora*). Among them, *Proschkinia buluheimii*, *Navicula mollis*, *Navicula halophila* and *Proschkinia* sp. could inhabit in the water with the salinity over 120‰.

2) The biomass and total lipid content of twenty-one diatom species were investigated, including 14 freshly isolated species and 7 collected species which were from the Lab Diatom Collection. The lipid content of fifteen species exceeded 20% dry weight, and the top two species *Achnanthes amoena* and *Proschkinia* sp. were up to 40% dry weight, 48.61% and 41.42%, respectively. Considering several aspects, such as biomass, lipid

content, the output cost, *Bacillaria paradoxa*, *N. molli*, *N. halophila* and *Phaeodactylum tricornutum* were suitable for biofuel production.

3) *Bacillaria paradoxa* was selected to investigate the kinetic accumulation of neutral lipids and the consumption of nutrients during the growth period. It was found that the lipid accumulation began at the growth stationary phase, and the essential nutrients (e.g., NO_3^- , PO_4^{3-} , and SiO_3^{2-}) consumption revealed significant negative correlations with the lipid accumulation. Among these three nutrients, silicate used fastest and the content decreased half at the second day during the exponential phase. Moreover, at the six day, the cells were grown in the Si-starvation culture, and they got into the stationary phase.

4) *Thalassiosira pseudonana* was selected to investigate the growth condition and the lipid accumulation under different carbon dioxide concentrations. It was found that the adaptive phase was prolonged accompanied with the increased carbon dioxide concentration. Under the 5 % CO_2 , *T. pseudonana* grew fastest the studied concentrations, and at the six day when the cells harvested, the lipid content was highest, reaching to 31 % dry weight.

5) The Nile red staining procedure was optimized, and the reliability of Nile red fluorescence intensity was discussed. The fluorescence intensity was measured after 10 min of incubation in the dark at room temperature with the 1 $\mu\text{g/mL}$ final Nile red concentration, than the Nile red-stained and unstained control cells were analyzed with a 530 nm excitation wavelength and a 575 nm emission wavelength.

Keywords: Bioenergy-algae; Diatom; Biomass; Lipid content; Carbon dioxide

第一章 前言

1.1 生物柴油及微藻生物质能

据统计,2008 年全球能源消耗量的近 88% 来自于化石燃料^[1]。化石燃料是指煤炭、石油、天然气等埋藏在地下和海洋下的不可再生的燃料资源。根据全世界对化石燃料的消耗速度估算,地球上现已探明储量的石油、天然气和煤炭的可供使用年限依次为 41 年、54 年和 155 年^[2]。自然界经历亿万年逐渐形成的化石燃料可能在未来一、二百年内被消耗殆尽,能源危机越来越紧迫。除此以外,化石燃料的燃烧可加剧温室气体的排放。温室气体不仅引发全球气候变暖,而且直接影响海洋环境及人类的生活。研究表明,全球平均气温升高大于 2℃,将导致海平面显著上升,淹没低地、河口三角洲及岛屿,因此亿万人不得不流离失所,许多物种将濒临灭绝^[3];而海洋因过多二氧化碳的吸入会导致水体酸化,pH 的下降将引起珊瑚礁的迅速退化,进而影响海洋物种的多样性,破坏海洋中的生态平衡^[4]。总而言之,从长远角度来讲,为了人类的生存,世界的稳定以及经济的发展,我们需要寻找干净的可再生能源。

可再生能源具有自我恢复原有特性的能力,包含太阳能、水能、生物质能、氢能、风能、潮汐能、地热能等。每一种可再生能源都具有其优势及劣势,因此要根据所应用的领域进行取舍。而在众多可再生能源中,生物质能因其在原料培养过程中亦能减少温室气体的排放而得到广泛的关注,必将在未来能源系统中占重要地位。生物质能包含有生物酒精、生物柴油、沼气以及生物氢能,其中最常见的为生物柴油^[4,5]。

1.1.1 生物柴油的发展

生物柴油是一种非常重要的可再生能源,其是以可再生原料(如植物油、动物脂肪、食用废油等)经转酯化反应而获得的长链烷基酯^[5-7]。据统计,生物柴油比重占整个欧盟生物质能产量的 82%,且由于政策及经济等因素,该比重在欧洲、巴西以及美国仍处于持续上升阶段^[4]。有文献指出 2005 年全球生物柴油的产量估算已达到了 38 亿升^[3]。生物柴油之所以得到广泛的关注,其原因主要有三大方面:

1) 从自身性能上来说,生物柴油具有高生物裂解性、高稳定性、高燃性、低毒性、可再生性,在使用过程中二氧化碳净排放量为零且不会释放其他对环境有害的物

质^[3,6]。

2) 从应用上来说,生物柴油能够和传统柴油以任意比例混合,仅需 1-2%的比例就可以改善原成分的低润滑性。除此以外,只需要对现有汽车引擎做少许改动,甚至不需要改动,就可以使用生物柴油^[4,8]。

3) 从社会效益上来说,生物柴油原料的生产能够创造更多的就业机会,从而带动农村偏远地区经济的发展^[9]。

然而,尽管生物柴油有广泛的应用前景,但就目前而言,其年产量还不足世界能源年产量的 1%^[10]。研究表明,购买原料的费用占生物柴油生产总费用的 75%(图 1.1)。因此,选择合适的原料是生物柴油得以大规模推广的关键所在。根据生物柴油发展的历史及应用现状,可以人为地把生产生物柴油的原材料分为三代。

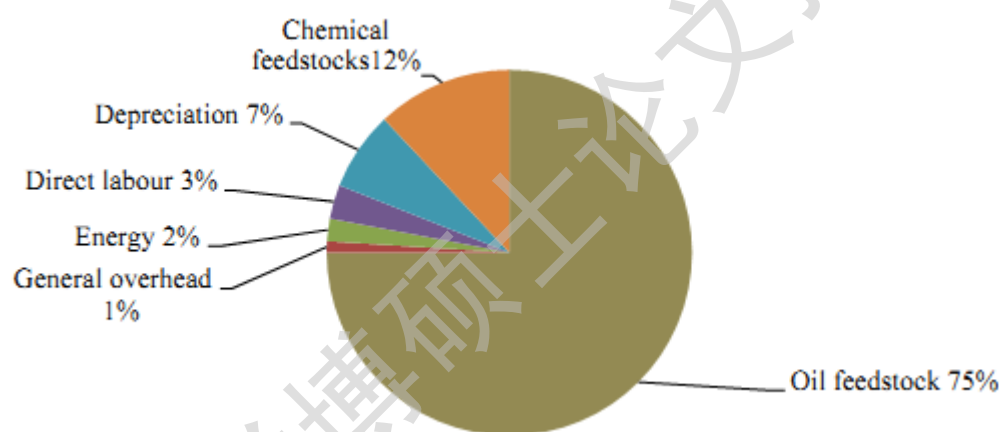


图 1.1 生物柴油生产过程中各部分消费的投入比重^[6]

Fig 1.1 General cost breakdown for production of biodiesel^[6]

第一代生物柴油的原料是以油菜籽、大豆、棕榈油和向日葵籽为代表。由于这类生物柴油成分近 95% 来自于可食用油,因此这些原料的使用将影响全球粮食市场及食品安全^[1,3]。例如,棕榈油和大豆油可供人类食用,把它们用于大规模生产生物柴油将引发“食物与能源”的竞争危机。而且鉴于这些农作物的生长周期较长,其生物柴油的年产量也是有限的。若要满足庞大的社会需求,则需要扩大种植面积。在马来西亚和印度尼西亚,森林大规模砍伐被用于种植棕榈。这种趋势不仅不能满足社会日益增长的能源需求,还将破坏生态平衡,降低物种多样性。

第二代生物柴油的原料是以麻风树果、荷荷巴油、烟草籽、食用废油和动物脂肪为代表。这些原料其油成分中大多含有对人体有害的成分,因此一般不作为食用性材

料^[11]。与第一代生物柴油相比，第二代生物柴油的生产不但消除了食物与能源的竞争关系，而且其占农业耕地更少，可在不适合农作物生长的地方种植，也可用于田间套种。除此以外，以动物脂肪为原料的转酯化产物比第一代柴油具有更多的优势，如具有高十六烷值，无腐蚀性等^[12]。然而，第二代生物柴油的产量并不能满足人类的需求，且动物脂肪中含有大量饱和脂肪酸，给生产过程中的转酯化反应带来许多困难^[13]。例如，牛脂中饱和脂肪酸约占总脂肪酸的 50%，这使其具有高熔点和高粘度，在转酯化反应中就需要消耗更多的能量。

总体说来，第一代与第二代生物柴油为能源市场带来利益的同时，也面临着很多问题，而归根结底，这些问题源自于原材料的生产力不够。

表 1.1 微藻与其他几种植物生物柴油生产力比较^[4]

Table 1.1 Comparison of microalgae with other biodiesel feedstocks^[4]

植物来源	含油量 %/细胞干重	产油量 L oil/ha year	土地使用面积 m ² year/kg biodiesel	生物柴油产量 kg biodiesel/ha year
玉米 (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
大麻 (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
大豆 (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
麻风树 (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
亚麻荠 (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
油菜 (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
向日葵 (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
棕榈 (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
微藻 (低油脂含量)	30	58700	0.2	51927
微藻 (中油脂含量)	50	97800	0.1	86515
微藻 (高油脂含量)	70	136900	0.1	121104

表 1.1 对比了几种常见的生物柴油原料的生产力。以总脂含量占干重 30% 的藻种为例，其每公顷生物柴油原料的年产量约是玉米的 342 倍；而较之产量最高的陆生植物——棕榈，约是其产量的 11 倍。有研究表明，若同样以总脂含量占干重 30% 的微藻为原料，只需美国现有农作物种植面积的 5% 即可满足全美所有运输燃油的消耗^[14]。由此看来，以微藻为原料的第三代生物柴油具有广泛的发展前景。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库